



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10070986 A**(43) Date of publication of application: **17.03.98**

(51) Int. Cl.

**C12N 15/09****C07H 21/04****C07K 14/52****C07K 16/24****C12P 21/02**// **C12N 1/21****C12P 21/08****C12Q 1/68****(C12N 1/21 , C12R 1:19 )**(21) Application number: **09144754**(22) Date of filing: **19.05.97**(30) Priority: **05.06.96 JP 08166791**(71) Applicant: **B M L:KK**(72) Inventor:  
**OGAWA KAZUYUKI**  
**TANAKA KAZUYA**  
**NAGATA KINYA**  
**TAKANO SHOICHI**(54) **HUMAN TH1 SPECIFIC PROTEIN, GENE  
CODING FOR THE SAME AND RELATED  
TRANSFORMANT, RECOMBINANT VECTOR  
AND ANTIBODY**

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

(57) Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a human Th1 specific protein which is composed of Th1 specific proteins being a helper T cell subset having a specific amino acid sequence and is useful for such purposes as specifying condition and type of immunity-related diseases on the basis of knowledge about polarization of distribution of Th1/Th2.

**SOLUTION:** This human Th1 specific protein, which is a new protein specific for human Th1 which is a helper T cell subset having amino acid sequence of the formula, and is useful as a means for specifying or correcting condition and type of immunity-related diseases on the basis of knowledge about polarization of distribution of Th1 and Th2, which are helper T cell subsets, is obtained by separating peripheral humikaryotic blood cells from human whole blood, exciting the cells with different T-cell activators to prepare CD4<sup>+</sup>T cells, selecting Th1 which produces interferon- $\gamma$  but does not produce interleukin-4, thn preparing genes specific for human Th1 by a subtraction method, integrating the genes into a vector, and developing them in host cells.

```

Met Lys Phe Val Pro Cys Leu Leu Val Thr Leu Ser Cys Leu Gly 16
Thr Leu Gly Glu Ala Pro Arg Glu Lys Glu Gly Ser Thr Gly Glu Glu 32
Phe His Phe Glu Thr Gly Gly Arg Asp Ser Cys Thr Met Arg Pro Ser 48
Ser Leu Gly Glu Gly Ala Gly Glu Val Trp Leu Arg Val Asp Cys Arg 64
Asn Thr Asp Glu Thr Tyr Trp Cys Glu Tyr Arg Gly Glu Pro Ser Met 80
Cys Glu Ala Phe Ala Ala Asp Pro Lys Pro Tyr Trp Asn Glu Ala Leu 96
Glu Glu Leu Arg Arg Leu His His Ala Cys Glu Gly Ala Pro Val Leu 112
Arg Pro Ser Val Cys Arg Glu Ala Gly Pro Glu Ala His Met Glu Glu 128
Val Thr Ser Ser Leu Lys Gly Ser Pro Glu Pro Asn Glu Glu Pro Glu 144
Ala Gly Thr Pro Ser Leu Arg Pro Lys Ala Thr Val Lys Leu Thr Glu 160
Ala Thr Glu Leu Gly Lys Asp Ser Met Glu Glu Leu Gly Lys Ala Lys 176
Pro Thr Thr Arg Pro Thr Ala Lys Pro Thr Glu Pro Gly Pro Arg Pro 192
Gly Gly Asn Glu Glu Ala Lys Lys Lys Ala Trp Glu His Cys Trp Lys 208
Pro Phe Glu Ala Leu Cys Ala Phe Leu Ile Ser Phe Phe Arg Gly 223

```

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-70986

(43) 公開日 平成10年(1998) 3月17日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 0 7 K 14/52			C 0 7 K 14/52	
16/24			16/24	
C 1 2 P 21/02			C 1 2 P 21/02	C
審査請求 未請求 請求項の数11 F D (全 17 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平9-144754

(22) 出願日 平成9年(1997) 5月19日

(31) 優先権主張番号 特願平8-166791

(32) 優先日 平8(1996) 6月5日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 591083336

株式会社ビー・エム・エル

東京都渋谷区千駄ヶ谷5丁目21番3号

(72) 発明者 小川 一行

埼玉県川越市の場1361番地1 株式会社ビ

ー・エム・エル総合研究所内

(72) 発明者 田中 和也

埼玉県川越市の場1361番地1 株式会社ビ

ー・エム・エル総合研究所内

(72) 発明者 永田 欽也

埼玉県川越市の場1361番地1 株式会社ビ

ー・エム・エル総合研究所内

(74) 代理人 弁理士 志村 光春

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトTh1特異的タンパク質及びこれをコードする遺伝子、並びにこれに関連する形質転換体、組換えベクター及び抗体

(57) 【要約】

【課題】ヘルパーT細胞のサブセットである、Th1とTh2との分布の極性化における知見に基づく、免疫関連疾患の病勢や病型の特定手段を提供すること。

【解決手段】ヒトTh1にのみ特異的な遺伝子をサブトランクション法により調製・特定し、この遺伝子を組み込んだ組換えベクターとこの組換えベクターで形質転換された形質転換体、この形質転換体等による上記遺伝子がコードするヒトTh1特異的タンパク質、さらにはこのヒトTh1特異的タンパク質を抗原とする抗体を調製して、これらの遺伝子、タンパク質及び抗体等を、Th1とTh2との分布の極性化の特定手段や是正手段として用いること。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】配列番号6で表されるアミノ酸配列のヒトTh1特異的タンパク質。

【請求項2】配列番号6で表されるアミノ酸配列の一部のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ請求項1記載のヒトTh1特異的タンパク質と実質的に同一の生物学的活性を有するヒトTh1特異的タンパク質。

【請求項3】配列番号6で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むヒトTh1特異的遺伝子。

【請求項4】配列番号5で表される塩基配列のヒトTh1特異的遺伝子。

【請求項5】配列番号5で表される塩基配列の一部の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつストリンジントな条件下で配列番号5で表される塩基配列のDNAとハイブリダイズし、さらに配列番号6で表されるアミノ酸配列を有するヒトTh1特異的タンパク質と実質的に同一の生物学的活性を有するヒトTh1特異的タンパク質をコードするヒトTh1特異的遺伝子。

【請求項6】請求項3乃至請求項5のいずれかの請求項記載のヒトTh1特異的遺伝子を含有する遺伝子発現用組換えベクター。

【請求項7】請求項6記載の遺伝子発現用組換えベクターで形質転換され、かつこの組換えベクターに含まれているヒトTh1特異的遺伝子が発現している形質転換体。

【請求項8】請求項1又は請求項2記載のヒトTh1特異的タンパクの全部若しくは一部を免疫原とし、かつヒトTh2特異的タンパク質との間においては免疫反応性を示さないポリクローナル抗体。

【請求項9】請求項1又は請求項2記載のヒトTh1特異的タンパク質のいずれかの部分をその抗原決定基とし、かつヒトTh2特異的タンパク質との間においては免疫反応性を示さないモノクローナル抗体。

【請求項10】その免疫原が請求項6記載の組換えベクターである請求項9記載のモノクローナル抗体。

【請求項11】請求項10記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、Th1特異的タンパク質及びこれをコードする遺伝子に関する技術分野に属する発明である。より詳細には、アトピー性疾患の発症、エイズの劇症化等に深く関わるヘルパーT細胞群におけるバランスの変化を迅速かつ簡便に特定する手段として用いることができるヒト1型ヘルパーT細胞にのみ特異的なタンパク質及びこれをコードする遺伝子に関する。また、本発明はこの遺伝子を組み込んだ遺伝子発現用組換えベクター、このベクターで形質転換した形質転

換体に関する技術分野に属する発明である。さらに、本発明は上記のTh1特異的タンパクを抗原とするポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体とこれを産生するハイブリドーマに関する技術分野に属する発明である。

## 【0002】

【従来の技術】近年、免疫学は驚くべき進歩を見せ、その医学分野における貢献は多大である。免疫学は、感染免疫、腫瘍免疫、アレルギー、アナフィラキシー等のような免疫反応でも、その促進と抑制の中心的役割を果たしているのは、マクロファージやリンパ球等が産生するサイトカインであることを既に明らかにしている。MosmannとCoffmanらは、マウス脾細胞から樹立した長期培養可能なCD4<sup>+</sup>T細胞クローンを、その産生するサイトカインの違いから異なる2つのサブセットに分類した(Mosmann, T. R., et al., J. Immunol., 136, 2348(1986))。

【0003】すなわち、主にIL-2, IFN- $\gamma$ 及びTNF- $\beta$ を産生する「T-helper 1 (Th1)」と、主にIL-4, IL-5, IL-6, IL-10及びIL-13を産生する「T-helper 2 (Th2)」とに分類した。ヒトにおいては、当初このようなヘルパーT細胞のサブセットの存在は疑問視されていたが、現在ではその存在が明らかに認められている(Romagnani, S., Immunology Today 12, 256(1991)等)。

【0004】現在、これらのマウスやヒトのヘルパーT細胞サブセットTh1, Th2の性状や機能がますます明らかになりつつあり、多くの免疫反応の調節にあずかる中心細胞としての生物学的意義が注目されている。また、多くの感染症や免疫学的疾患では、患者リンパ球のTh1/Th2サブセットの分布において、そのいずれかに極端に偏る極性化が起こり、この極性化がその疾患の病勢や病型に反映していることが示唆されている。

【0005】例えば、Mycobacterium感染症においては、Mycobacteriumに対する免疫反応がDTH(遅延型)反応を主とした型をとっている場合はTh1優位であり、慢性化し進行型を呈する場合にはTh2優位になること、HIV感染症においては、Th1型のサイトカインの産生は長期間の非進行性患者に多く、Th2への極性化が起こると症状は進行又は劇症化すること及びアトピー性疾患の患者においては、Th2への極性化が起こると症状が悪化すること等が現在明らかになりつつある。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本発明が解決すべき課題は、上記のTh1/Th2サブセットの分布の極性化(以下、Th1/Th2インバランスという)における知見に基づいた、免疫関連疾患の病勢や病型の特定手段を提供することにある。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題に

ついて鋭意検討を行った。その結果、Th 1 に特異的なタンパク質とこれをコードする遺伝子及びTh 2 に特異的なタンパク質とこれをコードする遺伝子をそれぞれ特定、調製することができれば、これを基にして所望する免疫関連疾患の病勢や病型の特定手段を提供し得ることを見出し本発明を完成した。本願は、上記遺伝子の内、ヒトTh 1 に特異的なタンパク質及びこれをコードする遺伝子に関連するものである。

【0008】すなわち、本発明者は本願において、以下に掲げる発明を提供するものである。

【0009】請求項1において、配列番号6で表されるアミノ酸配列のヒトTh 1 特異的タンパク質を提供する。

【0010】請求項2において、配列番号6で表されるアミノ酸配列の一部のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ前記請求項1記載のヒトTh 1 特異的タンパク質と実質的に同一の生物学的活性を有するヒトTh 1 特異的タンパク質を提供する。

【0011】請求項3において、配列番号6で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むヒトTh 1 特異的遺伝子を提供する。

【0012】請求項4において、配列番号5で表される塩基配列のヒトTh 1 特異的遺伝子を提供する。

【0013】請求項5において、配列番号5で表される塩基配列の一部の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつストリンジェントな条件下で配列番号5で表される塩基配列のDNAとハイブリダイズし、さらに配列番号6で表されるアミノ酸配列を有するヒトTh 1 特異的タンパク質と実質的に同一の生物学的活性を有するヒトTh 1 特異的タンパク質をコードするヒトTh 1 特異的遺伝子を提供する。

【0014】請求項6において、前記請求項3乃至請求項5のいずれかの請求項記載のヒトTh 1 特異的遺伝子を含む遺伝子発現用組換えベクターを提供する。

【0015】請求項7において、前記請求項6記載の遺伝子発現用組換えベクターで形質転換され、かつこの組換えベクターに含まれているヒトTh 1 特異的遺伝子が発現している形質転換体を提供する。

【0016】請求項8において、前記請求項1又は請求項2記載のヒトTh 1 特異的タンパク質の全部若しくは一部を免疫原とし、かつヒトTh 2 特異的タンパク質との間においては免疫反応を示さないポリクローナル抗体を提供する。

【0017】請求項9において、前記請求項1又は請求項2記載のヒトTh 1 特異的タンパク質のいずれかの部分をその抗原決定基とし、かつヒトTh 2 特異的タンパク質との間においては免疫反応を示さないモノクローナル抗体を提供する。

【0018】請求項10において、その免疫原が前記請

求項6記載の組換えベクターである請求項9記載のモノクローナル抗体を提供する。

【0019】請求項11において、前記請求項10記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを提供する。

#### 【0020】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態について説明する。ヒトTh 1 に特異的な遺伝子〔以下、本発明Th 1 遺伝子という。この本発明Th 1 遺伝子には、特に断らない限り本発明の技術的範囲に入るべきヒトTh 1 特異的遺伝子（後述する）が含まれる。〕の由来となるヒトTh 1 とは、上記の通り、ヒトヘルパーT細胞のサブセットの一つである。

【0021】このヒトTh 1 は、以下のような特徴を有するヘルパーT細胞のサブセットである。

ヒトTh 1 は、IFN- $\gamma$ 及びTNF- $\beta$ を産生するが、IL-4及びIL-5を産生しない。

ヒトTh 1 は、IL-2及びIL-12に反応してよく増殖し、IL-4の存在により誘導が抑制される（これに対して、他方のサブセットのヒトTh 2 は、同様にIL-2に反応して増殖するが、ヒトTh 1 とは逆にIL-4に反応して増殖する。また、IFN- $\gamma$ の存在により誘導が抑制される）。

ヒトTh 1 の表面マーカーは、現在ヒトTh 2 と明確に区別できる表面マーカーは見出されておらず、ヒトTh 1 はヒトTh 2 と同様に、CD44<sup>hi</sup>、CD45<sup>RB<sup>hi</sup></sup>、LECAM-1<sup>hi</sup>の表現型を有する。

ヒトTh 1 は、ヒトTh 2 と異なり、IgE産生誘導活性は認められず、むしろこれを自ら産生するINF- $\gamma$ によって抑制する。

ヒトTh 1 は、抗原特異的DTHを誘起する。

ヒトTh 1 は、細胞内寄生性の細菌や原虫に対して一定条件のもと抵抗性を示す。

【0022】本発明Th 1 遺伝子は、例えばこのような特徴を有するヒトTh 1 クローンを樹立し、このクローンからヒトTh 1 のcDNAライブラリーを調製して得ることができる。

#### 【0023】A. ヒトTh 1 クローンの樹立

所望するヒトTh 1 クローンを樹立する前提として、このクローンを含むことが知られているCD4<sup>+</sup>T細胞集団を調製する。この調製方法は、通常公知の方法、例えばGianfranco, F.D.P., et al., J. Clin. Invest., 88, 346 (1991) に記載されている方法に従って調製することが可能である。

【0024】より具体的には、例えばヒトの全血から末梢血単核球を分離して、これを種々のT細胞活性化因子により刺激をして、所望するCD4<sup>+</sup>T細胞集団を調製することができる。T細胞活性化因子としては、例えばインゲンマメ由来の植物凝集素（PHA）等の非特異的T細胞活性化因子；IL-2、IL-4、IL-12等

のサイトカイン：PPD、ダニ抽出液等の刺激抗原等を挙げる事ができる。

【0025】この調製過程を経た後、後述するCD4<sup>+</sup>T細胞の単離工程に先立ち、予めCD4<sup>+</sup>T細胞以外の要素、例えばCD8<sup>+</sup>T細胞等を除去する工程に付することが好ましい。この除去工程としては、例えば抗CD4抗体を結合した磁気ビーズを用いてCD4<sup>+</sup>T細胞のみを濃縮する方法等を挙げる事ができる。

【0026】上記誘導過程を経た後、CD4<sup>+</sup>T細胞クローンを単離する。この単離方法も通常公知の方法、例えば限界希釈法に従ってこの単離を行うことができる。より具体的には、例えばPHA及びIL-2を添加した培地で、細胞をウエル当り0.5～10細胞となるように96穴マイクロプレートに播き、3～4日毎にIL-2添加培地で培地交換を続け、増殖が認められた（通常2～4週間）細胞について表面マーカーを調べ、CD4陽性のクローンのみを選択して、対象となるCD4<sup>+</sup>T細胞クローンとすることができ。このようにして単離したCD4<sup>+</sup>T細胞クローンの中から所望のヒトTh1クローンを選択・調製することができる。

【0027】CD4<sup>+</sup>T細胞クローンからのヒトTh1クローンの選択は、既に知られているヒトTh1とヒトTh2の性質の違いに基づき行われる。すなわち、例えば抗CD3抗体の刺激に応答してIFN- $\gamma$ を産生するがIL-4を産生しないクローンをヒトTh1クローンとして選択することができる（これに対して、逆にIL-4を産生するがIFN- $\gamma$ を産生しないクローンはヒトTh2として選択される）。

【0028】B. ヒトTh1に特異的なcDNAの調製  
ヒトTh1のcDNAとヒトTh2のcDNAには、双方に共通する遺伝子配列と、各々において特異的な遺伝子配列が存在することが予想される。このような状況下、所望するヒトTh1に特異的なcDNAを調製するには、ヒトTh1のcDNA集団からヒトTh2のcDNAと共通なものを除去する、いわゆるサブトラクション法を用いるのが有利である。

【0029】このサブトラクション法としては、例えばデービスらの方法（Davis, M. M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81, 2194 (1984)）を挙げる事ができる。この方法はサブトラクションの対象となる一方の素材のcDNAと、他方の素材の大過剰のpoly (A)<sup>+</sup>RNAをハイブリダイズさせて、ハイブリダイズせずに残ったcDNAをプローブとして、上記一方の素材のcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、上記一方の素材に特異的なcDNAクローンを得る方法である。

【0030】この方法は、大量のpoly (A)<sup>+</sup>RNAを必要とするという点が、poly (A)<sup>+</sup>RNAの素材を大量に入手することが困難な場合においては実施することが困難であるという欠点がある。そこで、比較的少量の

poly (A)<sup>+</sup>RNAを出発材料としてサブトラクションを行うために、PCR法を導入する方法も既に報告されている（例えば、gene expression screen法（Wang, Z. and Brown, D. D., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 88, 11505 (1991)）等）。この方法は、上記の方法における出発材料のcDNAを一度PCR法で増幅することを特徴とする方法であるが、上記サブトラクション操作とPCRによる増幅操作を繰り返すことで希少なmRNAをクローニングできるという利点を有する方法である。

10 【0031】本発明においては、一般的に正常のCD4<sup>+</sup>T細胞クローンの大量培養が困難であり、cDNAの鋳型となるmRNAを大量に確保することが困難である故、上記のサブトラクション法のうち、例えば上記「gene expression screen法」を用いることが好ましい。

【0032】より具体的には、通常公知の方法（例えば、poly (A)<sup>+</sup>RNAを鋳型として、逆転写酵素を用いる方法）でヒトTh1クローン及びヒトTh2クローン由来のcDNAを調製して、PCR法を用いてこれらのcDNAを増幅する。このcDNAの増幅に際しては、PCR法による増幅に適した長さのcDNA断片を得るために、予め制限酵素処理や超音波処理をcDNAに施すことが好ましい。

20 【0033】また、PCR法による増幅に必要なPCRプライマーとして、例えば、ヒトTh1及びヒトTh2それぞれに異なった塩基配列を有する特異的なプライマーを使用することができる。この特異的なプライマーは、通常化学合成により調製される。この方法によると、サブトラクション操作の後にヒトTh1由来のcDNAのみが増幅され、微量に混入し得るヒトTh2由来のcDNAの増幅を最小限に止め得るという点で有利である。

【0034】この場合は、予めこのPCR用プライマーがアニールし得る配列を含んだリンカーを上記cDNA断片の両端に結合させる必要がある。このため、上記断片化処理においては、このリンカーが結合し得る末端を有するcDNA断片を提供する制限酵素を用いることが好ましい。

40 【0035】PCRリンカーを結合した後のヒトTh1クローン及びヒトTh2クローン由来のcDNA断片群より、ある程度の長さを有する断片をアガロースゲル電気泳動等の分別手段により選別し、この選別したcDNA断片群をPCR法により増幅し、この増幅済断片をサブトラクションの出発材料とすることができ。

【0036】このようにして調製したcDNA断片群のうち、ヒトTh1クローン由来のcDNA断片群から、ヒトTh1及びヒトTh2に共通する塩基配列を有するcDNAを除いたcDNA断片群を選別して、所望する本発明Th1遺伝子を含んだ遺伝子ライブラリーを調製することができる。

50 【0037】この選別方法は、例えば一定量のヒトTh

1 クローン由来のcDNA断片群に過剰量の標識したヒトTh2クローン由来cDNA断片群をハイブリダイズさせて、この標識に基づいてヒトTh2クローン由来cDNA断片とハイブリダイズしたcDNAを除去して、残りの断片をヒトTh1にのみ特異的な遺伝子配列に基づいたcDNA断片として扱う方法を採ることができる。

【0038】ここで用いる標識は、上記選別方法を行うことが可能である限り特に限定されないが、可能な限り標識及び除去が簡便な手段を用いることが好ましいことは勿論である。かかる点より、例えばビオチンでcDNA断片を標識して、標識されたcDNA断片をストレプトアビジンに吸着させる手法等を用いることが有利である。

【0039】なお、上記の手段により選別されたヒトTh1にのみ特異的な遺伝子配列に基づいたcDNA断片を、さらにPCR法によって増幅させて再び上記の選別手段を行う過程を繰り返すことによって、所望するcDNA断片を濃縮・増幅することができる。

【0040】このようにして調製した、cDNA断片を用いて、本発明Th1遺伝子を含んだ遺伝子ライブラリーを得ることができる。かかる遺伝子ライブラリーの調製工程については、通常公知の方法を用いることができる。

【0041】すなわち、上記cDNA断片を適切な遺伝子導入用ベクターに組み込み、これを選択した遺伝子導入用ベクターに応じた宿主に導入することにより所望する遺伝子ライブラリーを調製することができる。なお、この遺伝子導入用ベクターにcDNA断片が組み込まれたか否かは、このベクターが保有する、例えばlacZ遺伝子活性によるカラーセクション等によって確認することができる。

【0042】ここで用いる導入用ベクターは、特に限定されず、例えばプラスミドとしては、pBluescript, pUC18, pBR322, pBGP120, pPCφ1, pPCφ2, pPCφ3, pMC1403, pLG200, pLG300, pLG400等を; λファージとしては、λgt10, λZAPII等を挙げることができるが、取扱いの簡便さから上記lacZ遺伝子をマーカーとして保有するプラスミドを用いることが好ましい。具体的には、上記導入用ベクターのうち、pBluescript, pUC18, pBGP120等を選択することが好ましい。なお、この遺伝子ライブラリーの調製工程を市販の遺伝子ライブラリー調製用キットを用いて行うことも可能である。

【0043】C. 本発明Th1遺伝子の単離  
上記のようにして調製した遺伝子ライブラリーから、直接DNAを抽出して、それらのうちのいくつかの塩基配列を決定して、それらの塩基配列から本発明Th1遺伝子を有するクローンを選別することも可能であるが、予

めさらにクローンを選別して確実に本発明Th1遺伝子を有するクローンを特定することが好ましい。

【0044】かかる選別方法としては、通常公知の方法を用いることができる。たとえば、上記のごとく調製した、ヒトTh1に特異的な遺伝子に基づく遺伝子ライブラリー及び別に調製したヒトTh2に特異的な遺伝子に基づく遺伝子ライブラリーに由来する遺伝子を調製し、これに標識を施して標識プローブとして、ヒトTh1に特異的な遺伝子に基づく遺伝子ライブラリーのレプリカとハイブリダイズさせて、ヒトTh1に特異的な遺伝子のプローブとはハイブリダイズするが、ヒトTh2に特異的な遺伝子のプローブとはハイブリダイズしないクローンを選別して、このクローンを本発明Th1を保有するクローンとして、後述する本発明Th1遺伝子の塩基配列を決定する対象とすることができる。

【0045】なお、さらに慎重を期するために、例えばヒトTh1及びヒトTh2の全RNA又はpoly(A)<sup>+</sup>RNAを用いたノーザンブロッティング法を用いて発現するmRNAのパターンを比較して、後述する本発明Th1遺伝子の塩基配列を決定する対象となるクローンを決定付けることもできる。

【0046】このようにして調製したクローンにおける本発明Th1遺伝子の塩基配列の決定手段は通常公知の方法を用いて行うことができる。例えば、マキサム・ギルバート法 (Maxam, A. M., and Gilbert, W., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 74, 560 (1977)), ゲノミック・シーケンシング法 (Church, G. M. and Gilbert, W., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81, 1991 (1984)), マルチプレックス法 (Church, G. M. and Kieffer-Higgins, S., Science, 240, 185 (1988)), サイクルシーケンシング法 (Murray, V., Nucleic Acids Res., 17, 8889 (1989)), ジデオキシ法 (Sanger, F., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 74, 5463 (1977)) 等の方法を用いて、所望する本発明Th1遺伝子の塩基配列を決定することができる。なお、これらの原理を応用した塩基配列自動解析装置を用いて、この塩基配列を決定することも勿論可能である。

【0047】上記のごとくして決定された本発明Th1遺伝子の塩基配列を基にして、この本発明Th1遺伝子そのものを入手することができる。すなわち、上記と同様に調製した本発明Th1遺伝子の出所となるヒトTh1のcDNAを鋳型とし、上記のごとく決定された本発明Th1遺伝子の5'末端側と3'末端側の配列を含むDNA断片をプライマーとして、前出のPCR法により、本発明Th1遺伝子を大量に増幅させて入手することができる。

【0048】また、上記のごとく塩基配列を決定したヒトTh1遺伝子断片そのものをプローブとして、ヒトTh1から作出したcDNAの遺伝子ライブラリーから本発明Th1遺伝子を有するクローンを選別して、本発明Th1遺伝子の全長を入手する伝統的な手法を用いるこ

とも可能である。

【0049】さらに、ホスファイトートリエステル法 (Ikehara, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81, 5956(1984)) 等の通常公知の方法を用いて本発明Th1遺伝子を化学合成することも可能であり、これらの化学合成法を応用したDNAシンセサイザーを用いて本発明Th1遺伝子を合成することも可能である。

【0050】なお、このようにして製造する本発明Th1遺伝子の塩基配列の一部を改変して、この塩基配列の一部の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなる改変遺伝子 (この本発明Th1遺伝子に対する相同性は、概ね70%以上である) の存在を本発明者は認識し、このような改変遺伝子にも本発明の技術的範囲は及ぶものである。

【0051】この本発明の技術的範囲が及び得るヒトTh1遺伝子は、ストリンジェントな条件下 [系におけるDNA同士のハイブリッドが形成しにくい条件 [具体的には、系の温度 (高い程ハイブリッドしにくい) や塩濃度 (低い程ハイブリッドしにくい) や、ホルムアミド等の変性剤の濃度 (高い程ハイブリッドしにくい) 等に依存する] のことをいう。] で配列番号5 (後述する) で表される塩基配列のDNAとハイブリダイズし、さらに配列番号6 (後述する) で表されるアミノ酸配列を有するヒトTh1特異的タンパク質と実質的に同一の生物学的活性を有するヒトTh1特異的タンパク質をコードするヒトTh1特異的遺伝子である。

【0052】ここにいう「実質的に同一」とは、その生物学的活性が比較の対象となるヒトTh1特異的タンパク質の生物学的活性と質的及び/又は量的に同一性を有することを意味する。具体的なヒトTh1特異的タンパク質の生物学的活性については後述する。

【0053】この遺伝子改変法として、通常公知の方法、例えばいわゆるサイトスペシフィックミュータジェネシス (Site-Specific Mutagenesis) (Mark, D. F., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81, 5662(1984)) 等の方法を用いて、所望の遺伝子改変を行うことができる。

【0054】このようにして入手した本発明Th1遺伝子を用いて、疾患の局所におけるTh1/Th2バランスのチェックを行うことができる。すなわち、疾患の局所のmRNAを抽出して、例えばRT-PCR法 ("PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications" Innis, M. A., et al., ed., Academic Press, San Diego, 1990) を用いて、この組織における本発明Th1遺伝子の発現の程度を測定して、疾患の局所におけるTh1/Th2バランスのチェックを行うことができる。

【0055】このTh1/Th2バランスをチェックすることにより、上記従来技術の欄に記載したごとく、Th1/Th2インバランスが重大な要素となる疾患、例えばHIV感染症、アレルギー疾患、各種の感染症等の

症状の推移等をより確実に把握することができる。

【0056】なお、このTh1/Th2バランスのチェックは、後述するヒトTh1のポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を用いて行うことも勿論可能であるが、ここに示したチェック手段は、これらの抗体を用いることが困難な局面、例えば目的のタンパク質の発現量が極微量である場合等に際して有効なチェック手段である。

【0057】D. 本発明ヒトTh1タンパク質の製造：さらに、このようにして入手した、本発明Th1遺伝子を用いて、組換えヒトTh1特異的タンパク質 (以下、本発明ヒトTh1タンパク質という。この本発明ヒトTh1タンパク質には、特に断らない限り上記の改変遺伝子から翻訳され得るヒトTh1特異的タンパク質が含まれ、勿論これらの改変遺伝子から翻訳され得る改変タンパク質は、改変されていないヒトTh1特異的タンパク質と実質的に同一の生物学的活性を有する。) を製造することができる。この本発明ヒトTh1タンパク質は、上記本発明Th1遺伝子を利用して、通常公知の一般的な遺伝子組換え技術に従って製造することができる。

【0058】より具体的には、本発明Th1遺伝子が発現可能な形態の遺伝子発現用ベクターに本発明Th1遺伝子を組み込み、この遺伝子発現用ベクターの性質に応じた宿主にこの組換えベクターを導入して形質転換し、この形質転換体を培養等することにより所望の本発明ヒトTh1タンパク質を製造することができる。

【0059】ここで用いる遺伝子発現用ベクターは、通常発現しようとする遺伝子の upstream にプロモーター、エンハンサー、及び downstream に転写終了配列等を保有するものを用いるのが好適である。

【0060】また、本発明Th1遺伝子の発現は、直接発現系に限らず、例えばβ-ガラクトシダーゼ遺伝子、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ遺伝子やチオレドキシシン遺伝子を利用した融合タンパク質発現系とすることもできる。

【0061】かかる遺伝子発現用ベクターとしては、例えば宿主を大腸菌とするものとしては、pQE, pGEX, pT7-7, pMAL, pTrxFus, pET, pNT26CII等を例示することができる。また、宿主を枯草菌とするものとしては、pPL608, pNC3, pSM23, pKH80等を例示することができる。

【0062】また、宿主を酵母とするものとしては、pGT5, pDB248X, pART1, pREP1, YEp13, YRp7, YCp50等を例示することができる。

【0063】また、宿主を哺乳動物細胞又は昆虫細胞とするものとしては、p91023, pCDM8, pCDL-SRα296, pBCMGSNeo, pSV2dhfr, pSVdhfr, pAc373, pAcYM1,



pRc/CMV, pREP4, pcDNAI等を例示することができる。

【0064】これらの遺伝子発現ベクターは、本発明ヒトTh1タンパク質を発現させる目的に応じて選択することができる。例えば大量に本発明ヒトTh1タンパク質を発現させることを企図する場合には、宿主として大腸菌、枯草菌又は酵母等を選択し得る遺伝子発現ベクターを選択するのが好ましく、少量でも確実に活性を有するように本発明ヒトTh1タンパク質を発現させることを企図する場合には、哺乳動物細胞や昆虫細胞を宿主として選択し得る遺伝子発現ベクターを選択するのが好ましい。

【0065】なお、上記のように既存の遺伝子発現ベクターを選択することも可能であるが、目的に応じて適宜遺伝子発現ベクターを作出して、これを用いることも勿論可能である。なお、これらの遺伝子発現用ベクターも本発明の技術的範囲に入るものである。

【0066】本発明Th1遺伝子を組み込んだ上記遺伝子発現用ベクターの宿主細胞への導入及びこれによる形質転換法は、一般的な方法、例えば宿主細胞が大腸菌や枯草菌である場合には、塩化カルシウム法やエレクトロポレーション法等を；宿主が哺乳動物細胞や昆虫細胞の場合はリン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法又はリボソーム法等の手段により行うことができる。

【0067】このようにして得られる形質転換体を常法に従い培養することにより、所望する本発明ヒトTh1タンパク質が蓄積される（このような形質転換体も本発明の技術的範囲に含まれる。）。かかる培養に用いられる培地は、宿主の性質に応じて適宜選択することができるが、例えば宿主が大腸菌である場合には、LB培地やTB培地等が、宿主が哺乳動物細胞の場合には、RPMI1640培地等を適宜用いることができる。

【0068】この培養により得られる培養物からの本発明ヒトTh1タンパク質の単離及び精製は、常法に従い行うことが可能であり、例えば培養物を、本発明ヒトTh1タンパク質の物理的及び／又は化学的性質を利用した各種の処理操作を用いて行うことが可能である。

【0069】具体的には、タンパク沈澱剤による処理、限外濾過、ゲル濾過、高速液体クロマトグラフィー、遠心分離、電気泳動、特異抗体を用いたアフィニティクロマトグラフィー、透析法等を単独で又はこれらの方法を組み合わせて用いることができる。このようにして、本発明ヒトTh1タンパク質を単離、精製することが可能である。

【0070】なお、上記の本発明Th1遺伝子発現系において、宿主として患者自身から分離したT細胞又は骨髓細胞等を本発明Th1遺伝子で形質転換して、この形質転換体を患者に戻すことにより、いわゆる遺伝子治療に利用することが可能である。この場合の発現用ベクターとしては、例えばレトロウイルスやアデノウイルス等

のウイルスベクター等を挙げることができる。

【0071】この形質転換細胞を用いて行う遺伝子治療は、Th2優位のTh1/Th2インバランスに陥っていることが重大な原因となる疾病の患者に対して行うことができる。具体的には、例えばHIV感染者、慢性化した感染症患者、癌患者や即時型アレルギー疾患患者等に上記形質転換細胞を投与して、これによりこれらの疾患の重大な原因となっているTh2優位のTh1/Th2インバランスを、投与した形質転換細胞にヒトTh1タンパク質を患者の体内で発現させることにより遺伝子治療を行うことができる。

【0072】E. 本発明ヒトTh1タンパク質に対する抗体の製造：本発明は、上記本発明ヒトTh1タンパク質に対する抗体にも関する。すなわち、本発明ポリクローナル抗体は、ヒトTh1タンパク質を免疫抗原として免疫した動物に由来する免疫血清から製造することができる。

【0073】ここで使用される免疫抗原としてのヒトTh1タンパク質は、特に限定されるものではなく、上記のごとく調製される本発明Th1遺伝子（その塩基配列の一部を改変したものも含む）がコードする本発明ヒトTh1タンパク質を用い得ることは勿論のこと、本発明Th1遺伝子の一部断片がコードする本発明ヒトTh1タンパク質断片や本発明ヒトTh1タンパク質に直接酵素処理等を施して、又は化学合成して得られる本発明ヒトTh1タンパク質の部分ペプチドをも本発明ポリクローナル抗体を製造する上での免疫抗原とすることができる。

【0074】また、免疫動物と同種・同系統の動物由来の細胞株を、ヒトTh1タンパク質（本発明ヒトTh1タンパク質を含む）又はその一部をコードする遺伝子を組み込んだ発現ベクターを導入して形質転換して、この形質転換細胞をその免疫動物に移植することにより本発明ポリクローナル抗体を調製することができる。すなわち、形質転換細胞を移植した動物の体内で、持続的に上記ヒトTh1タンパク質がその形質転換細胞で作られ、それに対する抗体が産生されて、これを本発明ポリクローナル抗体とすることもできる（Nemoto, T., et al., Eur. J. Immunol., 25, 3001(1995)）。

【0075】さらに、上記ヒトTh1タンパク質を発現する発現ベクターを直接動物に筋注や皮下注等の手段で投与することにより、その動物内で上記ヒトTh1タンパク質を継続的に産生させて、上記の形質転換細胞を移植した場合と同様に本発明ポリクローナル抗体を製造することができる（Raz, E., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91, 9519(1994)）。

【0076】一方、本発明モノクローナル抗体は、本発明ポリクローナル抗体の場合と同様の方法で、免疫した動物の免疫細胞と動物の骨髓腫細胞とのハイブリドーマを作出し、これによりヒトTh1を認識する抗体を産生



するクローンを選択し、このクローンを培養することにより製造することができる。

【0077】また、免疫される動物も特に限定されるものではなく、マウス、ラット等を広く用いることができるが、モノクローナル抗体を製造する場合には、細胞融合に用いる骨髓腫細胞との適合性を考慮して選択することが望ましい。免疫は一般的方法により、例えば上記免疫抗原を免疫の対象とする動物に静脈内、皮内、皮下、腹腔内注射等で投与することにより行うことができる。

【0078】より具体的には、上記免疫抗原を所望により通常のアジュバントと併用して、免疫の対象とする動物に2～14日毎に上記手段により数回投与し、ポリクローナル抗体製造のための免疫血清又はモノクローナル抗体製造のための免疫細胞、例えば免疫後の脾臓細胞を得ることができる。

【0079】モノクローナル抗体を製造する場合、この免疫細胞と細胞融合する他方の親細胞としての骨髓腫細胞としては、既に公知のもの、例えばSP2/O-Ag14, P3-NS1-1-Ag4-1, MPC11-45, 6, TG1.7 (以上、マウス由来) ; 210, RCY, Ag1.2, 3 (ラット由来) ; SKO-007, GM15006TG-A12 (以上、ヒト由来) 等を用いることができる。

【0080】上記免疫細胞とこの骨髓腫細胞との細胞融合は、通常公知の方法、例えばケーラーとミルシュタインの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., *Nature*, 256, 495 (1975)) 等に準じて行うことができる。

【0081】より具体的には、この細胞融合は、通常公知の融合促進剤、例えばポリエチレングリコール (PEG), センダイウイルス (HVJ) 等の存在下において、融合効率を向上させるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を必要に応じて添加した通常の培養培地中で行い、ハイブリドーマを調製する。所望のハイブリドーマの分離は、通常の選別用培地、例えばHAT (ヒポキサンチン, アミノプテリン及びチミジン) 培地で培養することにより行うことができる。すなわち、この選別用培地において目的とするハイブリドーマ以外の細胞が死滅するのに十分な時間をかけて培養することによりハイブリドーマの分離を行うことができる。このようにして得られるハイブリドーマは、通常の限界希釈法により目的とするモノクローナル抗体の検索及び単一クローン化に供することができる。

【0082】目的とするモノクローナル抗体産生株の検索は、例えばELISA法、ブランク法、スポット法、凝集反応法、オクタロニー法、RIA法等の一般的な検索法に従い行うことができる。このようにして得られるヒトTh1タンパク質を認識する所望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培地で継代培養することが可能であり、さらに液体窒素中で長時間保存することもできる (本発明の技術的範囲には、このハ

イブリドーマも含まれる。)

【0083】このハイブリドーマからの所望のモノクローナル抗体の採取は、このハイブリドーマを常法に従って培養して、その培養上清として得る方法や、ハイブリドーマをこのハイブリドーマに適合性が認められる動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法等を用いることができる。

【0084】なお、インビトロで免疫細胞をヒトTh1タンパク質又はその一部の存在下で培養し、一定期間後に上記細胞融合手段を用いて、この免疫細胞と骨髓腫細胞とのハイブリドーマを調製し、抗体産生ハイブリドーマをスクリーニングすることで所望するモノクローナル抗体を得ることもできる (Reading, C. L., *J. Immunol. Meth.*, 53, 261 (1982) ; Pardue, R. L., et al., *J. Cell Biol.*, 96, 1149 (1983) ) 。

【0085】さらに、免疫原として本発明ヒトTh1タンパク質を用いることなしに、免疫原として直接本発明Th1遺伝子又はその一部を用いて所望するモノクローナル抗体を製造することも可能である。すなわち、本発明Th1遺伝子で直接動物を免疫して (この免疫の際には、この遺伝子を含む遺伝子発現用組換えベクターを免疫原として用いることができる)、その遺伝子免疫動物の免疫細胞又は免疫血清を用いることによって、ヒトTh1タンパク質を特異的に認識するモノクローナル抗体を製造することができる。この遺伝子免疫を利用した方法の詳細については、後述の実施例において記載する。

【0086】また、上記で得られるポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体は、更に塩析、ゲル濾過法、アフィニティクロマトグラフィー等の通常的手段により精製することができる。このようにして得られるポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体は、ヒトTh1タンパク質に特異反応性を有する抗体である。

【0087】上記ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体は、体内のTh1/Th2バランスをチェックする手段として用いることができる。すなわち、上記抗体をELISA, RIA, 免疫組織化学的手法、フローサイトメトリーによる解析、ウエスタンブロット法等に用いることによって、検体中のヒトTh1量を特定することにより、体内のTh1/Th2バランスをチェックして、上記従来技術の欄に記載したごとく、Th1/Th2インバランスが重大な要素となる疾患、例えばHIV感染症、アレルギー疾患、各種の感染症等の症状の推移等をより確実に把握することができる。

【0088】また、上記のようにして得られるポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体は、例えばTh1が優位のTh1/Th2インバランスを是正する抗体として用いることができる。

【0089】なお、動物由来の抗体においては、そのまま人間に投与する場合に抗原性が認められ、そのままヒトに投与するのには適さない面がある。そのために、動

物由来のモノクローナル抗体の遺伝子の可変領域をクローニングして、この可変領域の遺伝子とヒト型の抗体の遺伝子の定常領域の遺伝子と結合させて、この融合遺伝子を発現させて融合抗体を製造することができる (Clackson, T., et al., Nature, 352, 624(1991))。

【0090】この技術を上記モノクローナル抗体について適用することも可能である。すなわち、動物由来の上記モノクローナル抗体の可変領域とヒト型の抗体の定常領域とが融合した融合抗体を、例えばTh1が優位のTh1/Th2インバランスを是正する抗体として用いることもできる。

#### 【0091】

【実施例】以下、実施例等により本発明を具体的に記載するが、この実施例により本発明の技術的範囲が限定して解釈されるべきものではない。

【0092】【実施例1】 本発明Th1遺伝子の製造等

#### (1) ヘルパーT細胞クローンの調製

健康人の末梢血単核球 (PBMC)  $10^6$  細胞/mlに、ヒトTh1細胞を主に誘導するために、PHA (EYラボラトリーズ社製)  $1 \mu\text{g/ml}$ 、 $\text{rIL-12}$  (ジェンザイム社製)  $50 \text{ ng/ml}$  及び $\text{rIL-12}$  (R&Dシステムズ社製)  $5 \text{ ng/ml}$  を添加して5日間培養した。一方、ヒトTh2を主に誘導するために、PBMCにダニ抽出液 (鳥居薬品製) 2% (v/v)、 $\text{rIL-4}$  (ジェンザイム社製)  $20 \text{ ng/ml}$  及び抗 $\text{IFN-}\gamma$ 抗体 (ジェンザイム社製) を $5 \mu\text{g/ml}$ を添加して5日間培養した。5日後、各々の培養に $\text{rIL-2}$  (塩野義製薬製) を $40 \text{ U/ml}$  添加して、さらに7~10日間培養した。

\*

第 1 表

クローン	ドナー	一次刺激	サイトカイン産生 (ng/ml) <sup>a)</sup>		Th タイプ
			IFN- $\gamma$	IL-4	
1P04	KN	PHA	>50.0	<0.2	Th1
2P15	KT	PHA	19.2	<0.2	Th1
2P26	KT	PHA	<0.5	9.0	Th2
KN04	KN	Der <sup>b)</sup>	<0.5	4.9	Th2

a) 細胞 ( $6 \times 10^5$  cells/300  $\mu\text{l}$ /well) をOKT3 を固相化した48穴プレート中で24時間培養後、上清中のIFN- $\gamma$ とIL-4の濃度をELISAにより測定した。

b) ダニ抽出液

【0096】(2) サブトラクトcDNAライブラリーの調製

上記(1)において得たヒトTh1クローン(2P15)及びTh2クローン(2P26)よりそれぞれpoly(A)<sup>+</sup>RNAをオリゴdTラテックス (日本ロシユ製) を用いて常法により調製した。次いで、これらのpoly(A)<sup>+</sup>RNAを鋳型にして、オリゴ(dT)プライマー (ファルマシア製) 及びMMLV逆転写酵素 (ファルマシア製) を用いて、それぞれのcDNAを約300ngを調製した。次に、それぞれのcDNAを、P ※50

\* 【0093】次に、この培養集団の中から、CD4<sup>+</sup>T細胞を分離するために、抗CD4抗体を結合した磁気ビーズ (ダイナル社製) を吸着させた後、磁石上でビーズと結合した細胞を回収した。次に、磁気ビーズ分離用試薬 (ダイナル社製) で、磁気ビーズからCD4<sup>+</sup>T細胞を解離させ、CD4<sup>+</sup>T細胞を得た。次いで、この純化したCD4<sup>+</sup>T細胞集団をPHA  $0.5 \mu\text{g/ml}$ 及び $\text{rIL-2}$ を $40 \text{ U/ml}$ 添加した、15%牛胎児血清添加RPMI 1640で、細胞をウエル当り0.5細胞となるように96穴マイクロプレートに播き、3~4日毎に上記と同様のIL-2添加培地で培地交換を続け、増殖が認められた細胞について表面マーカーを蛍光抗体法を用いて調べ、CD4に対して陽性のクローンのみを選択して、対象となるCD4<sup>+</sup>T細胞クローンとした (Gianfranco, F.D.P., et al., J.Clin. Invest. 88, 346(1991))。

【0094】次に、個々のCD4<sup>+</sup>T細胞クローンの細胞のタイプを調べるために、上記CD4<sup>+</sup>T細胞クローン ( $6 \times 10^5$  cells/300  $\mu\text{l}$  /ウエル) を、抗CD3抗体 (OKT3: オーツファーマスーティカル社製) をコートした48ウエルプレートで24時間培養し、その培養上清中のIL-4及びIFN- $\gamma$ の濃度をそれぞれのモノクローナル抗体を用いたELISAで測定した。その結果、IFN- $\gamma$ を産生するがIL-4を産生しないものをヒトTh1クローンとした。その結果を第1表に示す。

#### 【0095】

#### 【表1】

※CR法による増幅工程に処するに適した鎖長にするために、制限酵素Alu I (東洋紡績製)  $84 \text{ U}$ 及び同Rsa I (東洋紡績製)  $48 \text{ U}$ で、 $37^\circ\text{C}$ で5時間消化し、それぞれに異なるPCR用のリンカー (Balzer, H. J., and Baumlein, H., Nucleic Acids Res. 22, 2853(1994)) :

【0097】ヒトTh1用リンカー: 5' -CTC T TG CTT GAA TTC GGA CTA-3' (配列番号1)  
3' -ACAC GAG AAC GAA CTT A

AG CCT GAT-5' (配列番号2)

【0098】ヒトTh2用リンカー：5'-AGT T  
AC ACG TCT AGA ATG GCT-3'  
(配列番号3)

3'-ATAG TCA ATG TGC AGA T  
CT TAC CGA-5' (配列番号4)

【0099】を結合した後に、アガロース電気泳動により分子量が0.2Kbpから2KbpのcDNA断片のみを分取した。次に、このようにして得られた2P15由来及び2P26由来のcDNA断片を、それぞれ特有のPCR用プライマー：

【0100】ヒトTh1用プライマー：5'-CTC  
TTG CTT GAA TTC GGA CTA-  
3' (配列番号1)

ヒトTh2用プライマー：5'-AGT TAC AC  
G TCT AGA ATG GCT-3' (配列番号  
3)

【0101】を用いてPCRにより増幅した(熱サイクル：94℃1分；50℃1分；72℃2分；を30回)。このPCRにより得られたPCR産物をサブトラクションの出発材料とした。

【0102】すなわち、ヒトTh1(2P15)由来の上記PCR産物(5μg)に大過剰量のビオチン標識ヒトTh2(2P26)由来のPCR産物(100μg)

(DNA(100μg)に光反応性ビオチン(100μg)(ベクターラボラトリーズ社製)を加え、氷中で冷しながら、160Wサンランプ下約15cmの所に静置し、15分間照射した。その後、未反応ビオチンをブタノール抽出で除去し、この操作を再度繰り返した後、トリス・EDTA緩衝液(TE)に溶解してビオチン標識を完了した。)を加え、100℃で熱変性してそれぞれを1本鎖とした後に両者をハイブリダイズさせた。次いで、フリーの2P26由来のcDNA及び2P15由来のcDNAとハイブリダイズした2P26由来のcDNAを、系にストレプトアビジン(ライフテクノロジー社製)を100μg添加して、これに吸着させて、フェノール・クロロホルム抽出により除去した。この操作により、2P15由来のcDNAから2P26由来のcDNAと共通の塩基配列を持つcDNAが差し引かれ、2P15に対して特異的なcDNAを濃縮するサブトラクションが完了した。

【0103】次いで、この濃縮した2P15に対して特異的なcDNAについて、上記のPCR増幅及びサブトラクションを再度繰り返し、2P15に対して特異的なcDNAをさらに濃縮した後、再度上記と同様のPCR増幅を行い、約3μgのcDNAを得た。このようにして得た2P15に対して特異的なcDNAを、プラスミドpBluescript SK(-)(ストラタジーン社製)にクローニングしてサブトラクトcDNAライブラリーを調製した。次いで、このサブトラクトcDNAライブラリーの

一部で大腸菌(E. coli JM109株)を形質転換した。

【0104】(3)本発明Th1遺伝子断片の単離  
上記(2)で得た2P15由来のサブトラクトcDNA及び同様の方法により得られた2P26由来のサブトラクトcDNAを、それぞれランダムプライミング法を用いた市販の<sup>32</sup>P標識用キット(宝酒造製)を用いて標識し、これらを放射性プローブとした。一方、上記(2)において調製した2P15由来のcDNAライブラリーの一部で形質転換した大腸菌をプレートに播き、生育してきたコロニーについて2組のレプリカフィルターを作製した。この2組のレプリカフィルターに対して、上述の2種の放射性プローブをハイブリダイズさせ、0.1×SSCで洗浄後、オートラジオグラフィーでプローブ中のcDNAと相同なcDNAを含む大腸菌コロニーを同定した。

【0105】この方法で、約2100のコロニーをスクリーニングした結果、「2P26由来のサブトラクトcDNAプローブでは陽性シグナルを与えず、2P15由来のサブトラクトcDNAプローブに対してのみ陽性シグナルを与える」コロニーを320個認めた。この320個のcDNAクローンについて、コロニーハイブリダイゼーション法により、相互の異同を検討した結果、相互にハイブリダイズしない独立した33個のクローンを得た。次に、この33個のクローンについて、全RNAを用いたノーザンブロッティングにより、2P15と2P26との間でのmRNAの発現の差を検討した。その結果、2P26には殆ど発現しておらず、2P15にのみ発現が顕著であるクローンを14種得た。

【0106】次に、この14種のクローンのcDNAについて、さらにヒトTh1に対する特異性を確認するために、複数のヒトTh1クローン細胞及びヒトTh2クローン細胞との間でのmRNAの発現の差を、上記ノーザンブロッティング法により検討した。その結果、ヒトTh1クローン細胞にのみ共通に発現が認められるいくつかのcDNAクローンを得た。そのうちの1つのクローン(T48)の上記ノーザンブロッティング解析の結果を第1図に示す。

【0107】この第1図において、T48mRNAが上記2つのヒトTh1クローン(1P04及び2P15)に共通に発現していることが明らかになった(レーン1及びレーン2に対応する)。なお、T48mRNAはヒトTh2クローン(2P26及びKND4)のいずれにも発現していなかった(レーン3及びレーン4に対応する)。

【0108】cDNAクローンT48のDNAの塩基配列の解析を、蛍光ターミネーターを用いたジデオキシターミネーション法により(パーキンエルマーシータス社のキットを用いた)行った。その結果、クローンT48は、新規の塩基配列を有するDNAを有していた。そこで、次にクローンT48が有する上記遺伝子と相同の塩

基配列を含む遺伝子（本発明Th1遺伝子）の全長についてのクローニングを行った。

【0109】（4）本発明Th1遺伝子のクローニング所望のcDNAの全長をクローニングするために、T48mRNAの発現が高い細胞からλファージcDNAライブラリーを調製した。すなわち、上記2P15細胞より全RNAを抽出し、オリゴ（dT）ラテックス（日本ロシュ製）を用いて、poly（A）<sup>+</sup>RNAを常法により精製した。次に、市販のcDNAクローニングキット（ライフテクノロジー社製）を用いて、2本鎖cDNAを合成し、λgt22AファージのSal I/Not I サイトにクローニングした。これに引続き、市販のキット（ストラタジーン社製）を用いて、インビトロで上記λファージにおけるパッケージングを完了した。このパッケージング産物を大腸菌Y1090r<sup>+</sup>株に感染させ、約2×10<sup>6</sup>個の組換えλファージを得た。次に、上記（3）により得た新規のcDNA断片をランダムプライミング法を用いた市販の<sup>32</sup>P標識用キット（宝酒造製）を用いて標識し、これを放射性プローブとして、ブランクハイブリダイゼーション法によりλファージライブラリーのスクリーニングを行った。

【0110】その結果、13の陽性クローンを見出し、これらの陽性cDNAクローンのうち、最も長いインサートDNAを持つクローン3つをプラスミドpBluescript SK(-)（ストラタジーン社製）のEcoRV/Not I サイトにサブクローニングした。上記（3）と同様の蛍光ターミネーターを用いたジデオキシターミネーション法による塩基配列解析の結果、上記3つの陽性クローンのcDNAの互いに重複する部分の塩基配列は完全に一致しており、同一の遺伝子に由来するクローンであることが確認された。これらの3つの陽性クローンのうち、最も長いcDNAを有するクローンT48-4をT48と称し、以下に用いた。

【0111】（5）本発明Th1遺伝子の構造クローンT48に取り込まれたcDNAは1153bpの鎖長であり、ノーザンブロットングで測定されたmRNAの長さ（1.4kbp）にほぼ近いものであった。そして、その3' 端に、poly（A）付加シグナル及び逆転写反応で用いたオリゴdTの相補配列と思われる15個のA（アデニン）を有していた。

【0112】また、最も長いオープンリーディングフレームは、5' 端より79番目のATGより始まり、748番目のTGAで終わり、223アミノ酸残基よりなるタンパク質をコードしていると予測された。その開始コドン付近の塩基配列（TCGCCATGA）は、Kozak, M., Nucleic Acids Res., 15, 8125(1987) ) とほぼ相同であった。

【0113】以上の点より、クローンT48は、mRNAの3' 端から始まり、コーディング領域全長を経て

5' 側の非翻訳領域の一部に達するほぼ全長を含んでいると判断された。このクローンT48の有するcDNA配列を有する遺伝子を本発明Th1遺伝子とし、その配列を配列番号5に示す。また、この塩基配列がコードすると推定されるアミノ酸配列を配列番号6に示す。

【0114】なお、このアミノ酸配列を一字法で表すと以下ようになる。『MKFVPCLLLVTLSCGLTGQAPRQKQSGTGEFHFQTGGRDSCMRPSSLGQAGVWLVRVDCRNTDQTYWCEYRGQPSMCQAFADPKPYWNQALQELRLRHACQAGPVLRLPSVCREAGPQAHMQQVTSSLKGSPEPNQPEAGTPSLRPKATVKLTEATQLGKDSMEELGKAKPTTRPTAKPTQPGPRPGGNEEAKKAWEHCKWPFQALCAFLISFFRG』

〔上記アミノ酸配列において、A：アラニン、V：バリン、L：ロイシン、I：イソロイシン、P：プロリン、F：フェニルアラニン、W：トリプトファン、M：メチオニン、G：グリシン、S：セリン、T：トレオニン、C：システイン、Q：グルタミン、N：アスパラギン、Y：チロシン、K：リシン、R：アルギニン、H：ヒスチジン、D：アスパラギン酸、E：グルタミン酸、をそれぞれ示す。〕

【0115】また、本発明遺伝子大腸菌（E.coli K12-JM109 株）に組み込み、この形質転換体は、T48cDNAとして、工業技術院生命工学研究所に寄託番号FERM P-15618として寄託されている。

【0116】（6）インビトロにおける本発明Th1遺伝子の転写及び翻訳

市販のキット（ストラタジーン社製）を用いて、本発明Th1遺伝子を鋳型として、T7RNAポリメラーゼを用いてRNAを合成した。続いて<sup>35</sup>Sメチオニンの存在下に、市販のウサギ網状赤血球抽出物（プロメガバイオテック社製）を用いてインビトロ翻訳を行った。次いで、その翻訳産物をレムリ（Laemmli）の方法に従い、SDSポリアクリルアミド電気泳動で分析した。その結果、予測された分子量である25Kdと近似した分子量を有する単一のタンパク質が作られていることを確認した（第2図）。

【0117】（7）mRNA発現の組織特異性  
本発明Th1遺伝子由来のmRNA発現の組織特異性を調べるために、種々の組織に由来する細胞株の全RNAについてのノーザンブロットング解析を行った。その結果、用いたいずれの細胞株でも本発明Th1遺伝子由来のmRNAの発現が確認できなかった（第3図）。従って、本発明Th1遺伝子の発現は、Th1細胞を含む特定の細胞に限定されることが明らかになった。

【0118】〔実施例2〕大腸菌リコンビナント本発明ヒトTh1タンパク質の製造

（1）大腸菌用本発明Th1遺伝子発現ベクターの作製  
本発明Th1遺伝子の全長（配列番号5）を含むプラスミドDNA（pBluescript SK(-), 上記T48 cDNAから単離した）を鋳型にして、BamHIサイト及びエンテロキナーゼ認識切断部位をコードする塩基配列を

含むセンスプライマー〔5′-CGA GGA TCC GAT GAC GAT GAC AAA CAG GCC CCG AGA CAA AAG CAA-3′ (配列番号7)〕及びHindIII サイトを含むアンチセンスプライマー〔5′-CCA ACA AGC TTA CCA GGC CTT CTT CTT TGC TTC-3′ (配列番号8)〕を用いて本発明ヒトTh1タンパク質のN末端側から19アミノ酸残基及びC末端側から20アミノ酸残基を除いた中心部分に相当する遺伝子領域をPCR法を用いて増幅した。

【0119】このPCRは、耐熱性DNAポリメラーゼ (ストラタジーン社製) を用いて96℃・30秒, 60℃・1分, 76℃・3分を1サイクルとした熱サイクルを10サイクル行った。このPCRによって得られたPCR産物を、フェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈澱により精製した後、制限酵素 (BamHIとHindIII) で消化し、この消化物をアガロース電気泳動で精製した。得られた精製DNAをpQE30 (QIAGEN社製) のBamHI/HindIII サイトに挿入し、所望する大腸菌用の発現プラスミドpQE/T48を得た。

【0120】(2) リコンビナント本発明ヒトTh1タンパク質の製造

リコンビナント本発明ヒトTh1タンパク質を得るために、まず上述の大腸菌用の発現プラスミドpQE/T48で大腸菌M15を形質転換した。次に、得られた形質転換体をTB培地20ml中で37℃で一晩振盪培養を行った。得られた振盪培養物を1lのTB培地に接種し、さらに37℃での培養を継続した。600nmでの吸光度が1.0になった時点で、終濃度0.2mMになるようにIPTG (シグマ社製) を添加し、さらに3時間の振盪培養を継続した。得られた培養物に遠心処理を施して集菌した後、得られた菌体を溶解液 (8M Urea, 100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Tris-HCl pH8.0) 40mlに懸濁し、これを室温で1時間攪拌した。攪拌後、菌体の溶解物を遠心処理 (10000 ×g, 15分, 4℃) した後、この遠心上清に予め溶解液で平衡化したNi-NTA Agarose (QIAGEN社製) 16mlを添加し、これを室温で1.5時間攪拌した。

【0121】反応後のNi-NTA Agaroseを上述の溶解液及び洗浄液 (溶解液のpHを6.3に調整した溶液) でよく洗浄した後、カラムに充填し、計100mlの0~300mMのイミダゾール濃度勾配洗浄液で溶出し、これを2mlずつ分画した。溶出ピークに相当する分画を集めた後、透析によりUreaを段階的に除去し、最後に50mM Tris-HCl (pH7.3), 150mM NaCl, 10% グリセロール緩衝液で透析して、所望するリコンビナント本発明ヒトTh1タンパク質を得た。上記のようにして製造したリコンビナント本発明ヒトTh1タンパク質を、還元下でSDSポリアクリル

アミド電気泳動により解析した結果を第4図に示す。

【0122】〔実施例3〕本発明ヒトTh1タンパク質に対するモノクローナル抗体の製造

(1) 遺伝子免疫用本発明Th1遺伝子ベクターの調製及び同遺伝子による免疫本発明Th1遺伝子の全長 (配列番号5) を含むプラスミドDNA (pBluescript SK (-)) で形質転換した大腸菌 (E. coli K12-JM109 株)

(上記T48 cDNA) を増殖させて集菌し、これからプラスミドDNAを抽出して、制限酵素HindIII及びNotIを用いて消化し、アガロース電気泳動でベクターDNAを分離させて、インサートDNA (T48) を調製した。このようにして得たT48遺伝子 (開始コドン上流78bpからpolyAテイルまで) を、pRC/CMVプラスミド (Invitrogen社製) のサイトメガロウイルスプロモーターの下流にあるHindIII サイトとNotI サイトとの間に挿入して、所望するT48の全長を組み込んだプラスミドDNA (pRC/CMV-T48) を得た。

【0123】このpRC/CMV-T48の生理食塩水溶液を、8週齢BALB/cマウス (♀) の両足大腿筋及び尾皮内に各20μgを (1匹1回当り60μg)、3週おきに3回免疫した。特異抗体の上昇を、免疫血清を用いて間接蛍光抗体法及びウエスタンブロッティング法で確認後、さらに上記と同様の手順で2回追加免疫を行った。

【0124】(2) ハイブリドーマの調製

最終免疫の2週間後、免疫マウスの脾臓細胞を1×10<sup>6</sup>個及びミエローマ細胞を3×10<sup>6</sup>個をRPMI 1640培地中で混合した。次に、この混合物に遠心を施して得られた細胞の混合沈澱を、RPMI 1640培地で洗浄して上清を完全に除去した後、残った細胞沈澱物に、37℃に保温した50%ポリエチレングリコール (平均分子量1500) PBS溶液を45秒かけて攪拌しながら加えて、この残った細胞沈澱物を懸濁した。細胞を均一に懸濁しながらRPMI 1640培地を30ml加えた後、系に遠心分離を施して細胞を再び沈澱させた。

【0125】このようにして得られた細胞をHAT培地に懸濁し、96ウェルプレートに1ウェル当たり1×10<sup>5</sup>個/50μlの濃度でまき、37℃, 5%CO<sub>2</sub>の条件下でインキュベーターを用いて培養した。なお、培養開始後5日, 7日及び9日目にウェル当たり50μlのHAT培地を追加して栄養補給を行い、細胞を観察した。培養開始後10~14日目には、ほとんどのウェルに細胞増殖が見られるようになるので、それぞれの培養上清を一定量採集して1次スクリーニングを行った。すなわち、スライドに固定したT48由来cDNAを強制発現させたCOS7細胞 [pCDL-SRα/COS7, 調製法: 10%牛胎児血清 (FBS) を含むDME Mで18時間培養したCOS7細胞に、リポフェクシン

試薬(ライフテクノロジー社製)とT48由来cDNAを組み込んだp cDL-SR $\alpha$ プラスミドDNAを含んだOpti-MEM1培地(ライフテクノロジー社製)を重ねし、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃で6時間培養した。次いで、培地を除いた後、10%FBS/DMEMを加え、37℃で42時間培養した。〕と、室温で30分反応させた。この反応系を洗浄して、FITC標識ヤギ抗マウスIgGと遮光状態で室温下、30分間反応させた。再び反応系を洗浄後、これにカバーガラスをのせて蛍光顕微鏡で観察した。

【0126】なお、ここで用いたスライドは以下のようにして調製した。すなわち、T48由来cDNAを強制発現させたCOS7細胞(上記)を5×10<sup>5</sup>個/mlの割合で10%FBS/DMEMに懸濁し、この懸濁物を12穴スポットスライドガラスに40 $\mu$ l/穴で分注後、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃で3時間培養し、細胞をスライドガラス上に付着させた。次いで、このスライドをPBSで軽くリンスした後、氷冷した2%パラホルムアルデヒドPBS溶液で室温で10分間処理して細胞を固定した。次いで、再びPBSでリンス後、0.1%NP-40/PBS溶液で、室温下、5分間処理して細胞膜を可溶化してこのスライドを調製した。

【0127】(3)モノクローナル抗体の製造  
上記実施例2において、T48由来cDNAを組み込んだ細胞のみに反応したウエルについて、限界希釈法による単クローンの選択及び2次スクリーニングを行った。すなわち、単クローンの選択については、ウエル中の細胞数を測定し、細胞が1ウエル当たり0.2個になるように細胞を懸濁した培地を96ウエルプレートに分注して培養した後、再度培養上清を用いて上記スクリーニングを行った。なお、この操作は3回行った。また、2次スクリーニングは以下のように行った。

#### 【0128】免疫プロットによる方法

T48由来cDNAを強制発現させたCOS7細胞(上記)を、0.5%の界面活性剤であるNP-40を含むバッファーで溶解し、この溶解物に遠心分離を施して、核を除いた上清をサンプルとした。次に、このサンプルを還元及び非還元条件下で、SDSポリアクリルアミド電気泳動で分離した。

【0129】電気泳動を行ったゲルからニトロセルロース膜へ、この電気泳動により生じたバンドをプロットした後、ブロッキングバッファー(1%スキムミルク、5%FBS及び0.1%ツイーン20含有PBS)に浸し、4℃で一晩静置した後、さらにハイブリドーマの培養上清に浸し、室温で1時間反応させた。膜をウオッシュバッファー(0.1%ツイーン20含有PBS)に浸して15分間振盪して洗浄した。3回洗浄した後、希釈した標識二次抗体(ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG)と室温で1時間反応させた。ウオッシュバッファーで3回洗浄後、膜をケミルミネッセンス法により化

学発光させ、オートラジオグラフィー用フィルムに当ててバンドを検出した。

【0130】フローサイトメーターによる方法(この方法は、抗原となるタンパク質が細胞膜上に発現している場合に適用可能である)

T48由来cDNAを強制発現させたCOS7細胞を、10%FBS、RPMI1640培地で適当に希釈したハイブリドーマ上清に浮遊させ、氷上で30分反応させた。細胞をウオッシュバッファー(0.1%BSA, 0.05%NaN<sub>3</sub>含有PBS)で2回洗浄後、細胞を希釈したFITC標識ヤギ抗マウスIgG抗体溶液中で、氷上において30分間反応させた。細胞をウオッシュバッファーで2回洗浄後、PBSに懸濁し、フローサイトメーターにより蛍光を検出した。

【0131】上記方法により選別した本発明Th1遺伝子産物特異的モノクローナル抗体産生ハイブリドーマについて、単クローン細胞を大量に培養し、抗体を精製することによって所望する本発明ヒトTh1タンパク質に特異的なモノクローナル抗体が得られた。また、このハイブリドーマをBALB/cマウスの腹腔内に投与し、腹腔内で細胞が増殖して抗体を含む腹水が貯留した後、採集し、抗体を精製した。これらの結果、本発明ヒトTh1タンパク質に対する特異的モノクローナル抗体を産生するクローンTDA-3及びTFG-7を得ることができた。これらのうち、クローンTDA-3が産生するモノクローナル抗体を用いてT48由来cDNAを強制発現させたCOS7細胞の免疫プロットの結果を第5図に示す。また、同細胞のフローサイトメーターによる解析結果を第6図に示す。

【0132】この本発明ヒトTh1タンパク質に対して特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、Mouse Hybridoma TDA-3及びMouse Hybridoma TFG-7として、通商産業省工業技術院生命工学研究所に寄託されている(寄託番号は、Mouse Hybridoma TDA-3がFERM P-16033, 同TFG-7がFERM P-16034, である)。

【0133】〔実施例4〕ポリクローナル短期培養末梢血単核球での本発明ヒトTh1タンパク質の発現

#### (1)ポリクローナル短期培養末梢血単核球の調製

健康人の末梢血単核球(PBMC)を、ヒトTh1細胞を主に誘導するために、PPD(日本ビー・シー・ジー製造株式会社製)5 $\mu$ g/ml, rIFN- $\gamma$  50ng/ml及びrIL-12 5ng/mlを添加した10%牛胎児血清添加RPMI1640培地(ライフテクノロジー社製)中で4日間培養した。その一方、主にヒトTh2細胞を誘導するために、PBMCをゲン抽出液 1%(v/v), ハウスダスト抽出液(鳥居薬品製) 1%(v/v), rIL-4 100ng/ml及び抗IFN- $\gamma$ 抗体 10 $\mu$ g/mlを添加した、10%牛胎児血清添加RPMI1640培地中で4日間培養した。4日後、各培養にr

IL-2 50 U/mlを添加して、さらに6～10日間培養した。

【0134】(2) 本発明ヒトTh1タンパク質のフローサイトメトリーによる発現解析

上述のようにして得られたポリクローナル短期培養PBMCを、AIMV培地(ライフテクノロジー社製)中で1晩培養した後、モノクローナル抗体の一つ(Mouse Hybridoma TDA3由来)を用いて、膜蛍光抗体法により染色した。すなわち、上記細胞10<sup>5</sup>個を5 μg/mlのTDA3を含む染色液(5%牛胎児血清, 5%ヤギ血清, 1%BSA, 0.05%アジ化ナトリウム含有PBS)50 μl中に浮遊させ、氷上で30分間反応させた。反応後、細胞を洗浄液(0.5%BSA, 0.05%アジ化ナトリウム含有PBS)で2回洗浄後、フィコエリスリン標識ヤギ抗マウスIgMノグロブリン抗体(CHEMICON社製)2 μg/mlを含む染色液50 μl中に浮遊させ、氷上で30分間反応させた。2回の洗浄の後、細胞をフローサイトメーター(FACScan: BECTON DICKINSON社製)により解析した。第7図にその結果を示す。第7図において、本発明ヒトTh1タンパク質は細胞膜上に発現しているのが確認され、

配列

CTCTTGCTTG AATTGGGACT A

【0137】配列番号: 2

配列の長さ: 25

配列の型: 核酸

配列

TAGTCCGAAT TCAAGCAAG AGCACA

【0138】配列番号: 3

配列の長さ: 21

配列の型: 核酸

配列

AGTTACACGT CTAGAATGGC T

【0139】配列番号: 4

配列の長さ: 25

配列の型: 核酸

配列

AGCCATTCTA GACGTGTAA CTGATA

【0140】配列番号: 5

配列の長さ: 1153

配列の型: 核酸

鎖の数: 両形態

配列

CCCTTTAAAG GGTGACTCGT CCCACTTGTG TTCTCTCTCC TGGTGCAGAG TTGCAAGCAA 60  
GTTTATCAGA GTATCGCCAT GAAGTTCGTC CCCTGCCTCC TGCTGGTGAC CTGTCTCTGC 120  
CTGGGGACTT TGGGTACAGC CCGGAGGCAA AAGCAAGGAA GCACTGGGGA GGAATTCCAT 180  
TTCCAGACTG GAGGGAGAGA TTCTGCACT ATGCGTCCCA GCAGCTTGGG GCAAGGTGCT 240  
GGAGAAGTCT GGCTTCGCGT CCACTGCCGC AACACAGACC AGACCTACTG GTGTGAGTAC 300  
AGGGGGCAGC CCAGCATGTG CCAGGCTTTT GCTGCTGACC CCAAACCTTA CTGGAATCAA 360  
GCCCTGCAGG AGCTGAGGCG CCTTACCAT GCGTGCAGG GGGCCCCGGT GCTTAGGCCA 420

\* その発現はTh1タイプの短期培養PBMCに優位であることが確認できた。

【0135】

【発明の効果】本発明により、上記のTh1/Th2サブセットの分布における極性化における知見に基づいた、免疫関連疾患の病勢や病型の特定手段の重要な要素となるヒトTh1特異的遺伝子及びヒトTh1特異的タンパク質が提供される。また、本発明によりこのヒトTh1特異的遺伝子を含む遺伝子発現用組換えベクター、この遺伝子発現用組換えベクターで形質転換された形質転換体が提供される。さらに、本発明により上記ヒトTh1特異的タンパク質を抗原とするポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体とこれを産生するハイブリドマが提供される。

【配列表】

【0136】配列番号: 1

配列の長さ: 21

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

21

※鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

※ 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

25

★鎖の数: 1本鎖

30 トポロジー: 直鎖状

★ 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

21

☆鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖状

☆ 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

25

◆トポロジー: 不明

40 配列の種類: cDNA

起源

◆ ヒトTh1遺伝子



27	28
TCCGTGTGCA GGGAGGCTGG ACCCCAGGCC CATATGCAGC AGGTGACTTC CAGCCTCAAG	480
GGCAGCCCAG AGCCCAACCA GCAGCCTGAG GCTGGGACGC CATCTCTGAG GCCCAAGGCC	540
ACAGTGAAAC TCACAGAAGC AACACAGCTG GGAAAGGACT CGATGGAAGA GCTGGGAAAA	600
GCCAAACCCA CCACCCGACC CACAGCCAAA CCTACCCAGC CTGGACCCAG GCCCGGAGGG	660
AATGAGGAAG CAAAGAAGAA GGCCTGGGAA CATTGTGGA AACCCCTTCCA GGCCTGTGC	720
GCCTTTCTCA TCAGCTTCTT CCGAGGGTGA CAGGTGAAAG ACCCCTACAG ATCTGAOCTC	780
TCCCTGACAG ACAACCATCT CTTTTTATAT TATGCGCTT TCAATCCAAC GTTCTCACAC	840
TGGAAGAAGA GAGTTTCTAA TCAGATGCAA CGGCCCAAAT TCTTGATCTG CAGCTTCTCT	900
GAAGTTTGA AAAGAAACCT TCCTTTCTGG AGTTTGCGA GTTCAGCAAT ATGATAGGGA	960
ACAGGTGCTG ATGGGCCCAA GAGTGACAAG CATAACAAC TACTTATTAT CTGTAGAAGT	1020
TTTGCTTTGT TGATCTGAGC CTTCTATGAA AGTTTAAATA TGTAACGCAT TCATGAATTT	1080
CCAGTGTTCA GTAATAGCA GCTATGTGTG TGCAAAATAA AAGAATGATT TCAGAAATAA	1140
AAAAAAAA AAA	1153

【0141】配列番号：6

配列の長さ：223

配列の型：アミノ酸

トポロジー：不明

\* 配列の種類：蛋白質

起源

ヒトTh1

\*

配列

Met Lys Phe Val Pro Cys Leu Leu Val Thr Leu Ser Cys Leu Gly	16
Thr Leu Gly Gln Ala Pro Arg Gln Lys Gln Gly Ser Thr Gly Glu Glu	32
Phe His Phe Gln Thr Gly Gly Arg Asp Ser Cys Thr Met Arg Pro Ser	48
Ser Leu Gly Gln Gly Ala Gly Glu Val Trp Leu Arg Val Asp Cys Arg	64
Asn Thr Asp Gln Thr Tyr Trp Cys Glu Tyr Arg Gly Gln Pro Ser Met	80
Cys Gln Ala Phe Ala Ala Asp Pro Lys Pro Tyr Trp Asn Gln Ala Leu	96
Gln Glu Leu Arg Arg Leu His His Ala Cys Gln Gly Ala Pro Val Leu	112
Arg Pro Ser Val Cys Arg Glu Ala Gly Pro Gln Ala His Met Gln Gln	128
Val Thr Ser Ser Leu Lys Gly Ser Pro Glu Pro Asn Gln Gln Pro Glu	144
Ala Gly Thr Pro Ser Leu Arg Pro Lys Ala Thr Val Lys Leu Thr Glu	160
Ala Thr Gln Leu Gly Lys Asp Ser Met Glu Glu Leu Gly Lys Ala Lys	176
Pro Thr Thr Arg Pro Thr Ala Lys Pro Thr Gln Pro Gly Pro Arg Pro	192
Gly Gly Asn Glu Glu Ala Lys Lys Lys Ala Trp Glu His Cys Trp Lys	208
Pro Phe Gln Ala Leu Cys Ala Phe Leu Ile Ser Phe Phe Arg Gly	223

【0142】配列番号：7

配列の長さ：45

配列の型：核酸

※鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CGAGGATCCG ATGACGATGA CAAACAGGCC CCGAGACAAA AGCAA 45

【0143】配列番号：8

配列の長さ：33

配列の型：核酸

★鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

★40 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CCAACAAGCT TACCAGGCCT TCTTCTTGC TTC 33

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明Th1遺伝子由来のmRNA発現のTh1クローン選択性を示すノーザンブロット解析の結果を示す電気泳動写真像等を示した図面である。

【図2】インビトロにおける本発明Th1遺伝子の翻訳産物の電気泳動写真像等を示した図面である。

【図3】本発明Th1遺伝子由来のmRNA発現の組織特異性を示すノーザンブロット解析の結果を示す

☆電気泳動写真像等を示した図面である。

【図4】リコンビナント本発明ヒトTh1タンパク質を、還元下でSDSポリアクリルアミド電気泳動により解析した結果を示した図面である。

【図5】Mouse Hybridoma TDA-3が産生するモノクローナル抗体を用いてT48に由来するcDNAを強制発現させたCOS7細胞の免疫プロットの結果を示した図面である。

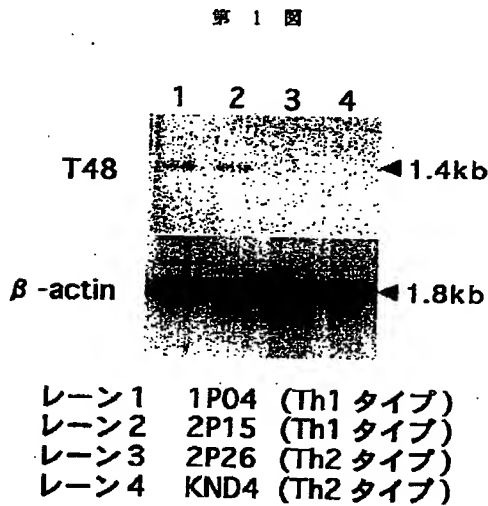
☆50

【図6】 Mouse Hybridoma TDA-3 が産生するモノクローナル抗体を用いてT48に由来するcDNAを強制発現させたCOS7細胞のフローサイトメーターによる解析の結果を示した図面である。

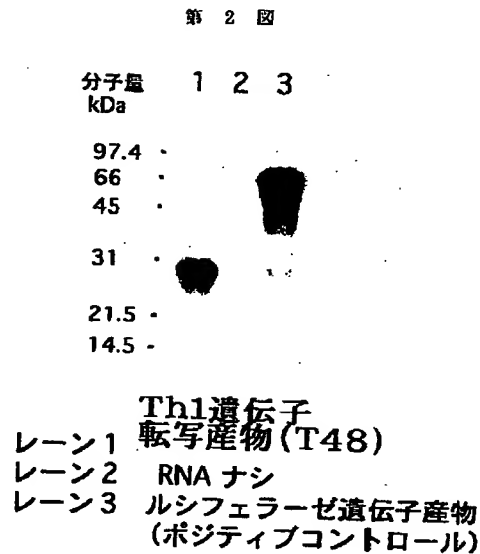
\* 【図7】 膜蛍光抗体法により染色したポリクローナル短期培養PBMCをフローサイトメーターにより解析した結果を示した図面である。

\*

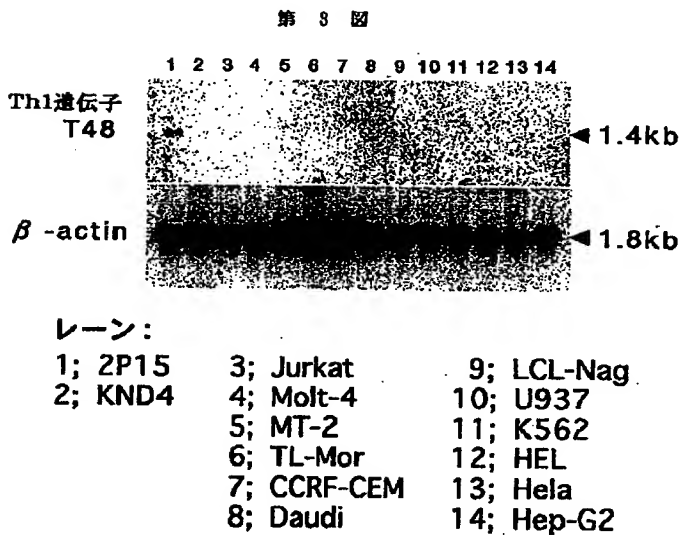
【図1】



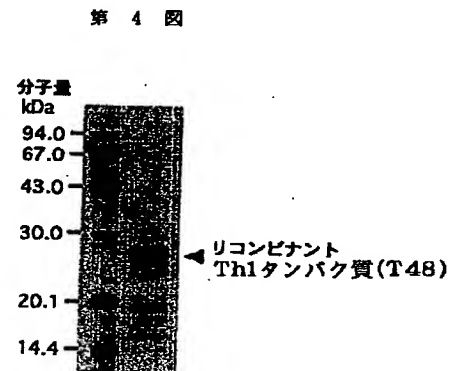
【図2】



【図3】

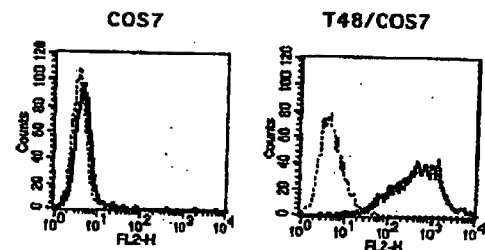


【図4】



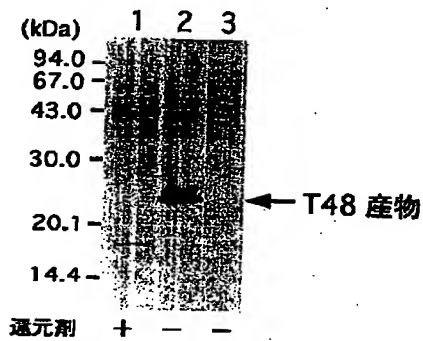
【図6】

第 6 図



【図5】

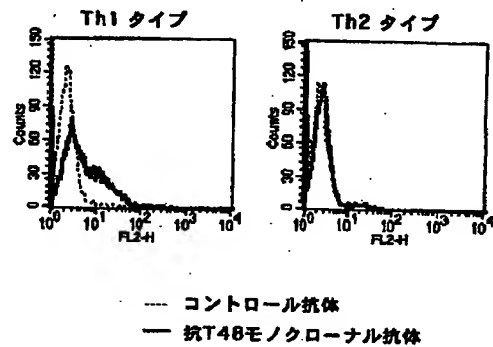
第5図



レーン  
 1. T48/COS7 (還元)  
 2. T48/COS7 (非還元)  
 3. コントロール/COS7 (非還元)

【図7】

第7図



フロントページの続き

(51)Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
// C 1 2 N 1/21			C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/08			C 1 2 P 21/08	
C 1 2 Q 1/68		7823-4B	C 1 2 Q 1/68	A
(C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:19)				

(72)発明者 高野 昇一  
 埼玉県川越市市場1361番地1 株式会社ビ  
 ー・エム・エル総合研究所内